

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**DETECCIÓN DE PROTEÍNAS DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A H1N1
MEDIANTE EL DESARROLLO DE UN INMUNOBIOSENSOR
ELECTROQUÍMICO**

POR

DANIEL OMAR ESPINOSA LERMA

**CON REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA
EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA APLICADA**

DICIEMBRE, 2019

**DETECCIÓN DE PROTEÍNAS DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A H1N1
MEDIANTE EL DESARROLLO DE UN INMUNOBIOSENSOR
ELECTROQUÍMICO**

Dra. Pilar del Carmen Morales san Claudio

Director de tesis

Dra. Melisa Dra. Melissa Marlene Rodríguez Delgado

Co-director de tesis

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos

Comité tutorial

Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño

Comité tutorial

Dr. Juan Francisco Villareal Chiu

Comité tutorial

Dedicatoria

A mi familia, especialmente

A mis padres

Javier Espinosa Tamayo

María Elisa Lerma Moya

A mi hermano Carlos Javier Espinosa Lerma

A mi cuñada Rubí Loera Vázquez

Y mi sobrina Naomi Abigail Espinosa Loera

Por todo su amor y apoyo que me han dado durante toda mi vida. Por impulsarme para seguir adelante para lograr mis metas.

Financiamiento

El presente trabajo de investigación fue financiado:

Por el Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

Por el apoyo brindado a la investigación científica de este trabajo por parte del Laboratorio de Microbiología de la FCQ, UANL bajo la dirección de la Dra. Pilar del Carmen Morales San Claudio y el Laboratorio de Instrumentación Analítica de la FCQ, UANL bajo la dirección de la Dra. Adriana Liñán y el Dr. Francisco Góngora.

Agradecimientos

- A mis padres por el apoyo emocional para incentivarme a seguir en mi preparación profesional para tener un mejor futuro. También gracias por el apoyo económico, cubriendo los gastos para que podamos conservar la beca de manutención y utilizarla en los trámites de titulación.
- A la UANL y la FCQ por la oportunidad de seguir estudiando al ofrecer estudios de posgrado.
- A mi directora de tesis por la asesoría proporcionada durante el proyecto, las observaciones realizadas a mi trabajo, la adquisición de los reactivos necesarios para que pueda llevar a cabo los experimentos y por proporcionarme una oficina en el que trabajar en el trabajo escrito y un laboratorio en el que pueda realizar la parte experimental de mi trabajo.
- Al comité tutorial por las revisiones y observaciones realizadas durante la realización del proyecto.
- A CONACYT por la beca otorgada que me sirvió para los gastos necesarios para realizar el proyecto y eventualmente los trámites de titulación.
- Al personal del laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas, por permitirme trabajar en la oficina y en los laboratorios cuando lo necesite.

- A mis profesores por los conocimientos impartidos los cuales fueron de mucha utilidad en la realización de mi proyecto de tesis ya sea directa o indirectamente.
- A mis compañeros y amigos por la compañía y apoyo proporcionado durante las clases y el trabajo en equipo realizado para ayudarnos mutuamente a aprobar las unidades de aprendizaje.
- A la coordinadora de posgrado, la dirección y la subdirección por las ayudas y toda la resolución de problemas relacionados con la inscripción a lo largo de los semestres.
- Al laboratorio de biotecnología del CELAES por guardar el antígeno y el anticuerpo
- Al laboratorio de análisis clínicos de la Facultad de Ciencias Químicas por la toma de muestra de sangre; lo que permitió obtener suero humano
- A los responsables del laboratorio de instrumentación analítica de la Facultad de Ciencias Químicas por permitirme el uso del potencióstato galvanostato.
- A los proveedores de material y reactivos necesarios para poder llevar a cabo la parte experimental del trabajo

Tabla de contenido

Resumen	1
MARCO TEÓRICO	3
Capítulo 1 Introducción	3
Capítulo 2 Agente patógeno	4
1.1 Virus influenza.....	4
2.2 Detección	8
Capítulo 3 Biosensores	9
3.1 Generalidades.....	9
3.2 Antecedentes de los biosensores	11
3.2.1 Agentes virales	12
3.2.2 Agentes bacterianos	14
3.2.3 Selectividad	16
3.2.4 Versatilidad.....	17
3.3. Biosensores electroquímicos.....	17
3.4. Voltamperometría	19
Capítulo 3. Hipótesis.....	23
Capítulo 4. Objetivos y metas	23
4.1 Objetivo general.....	23
4.2 Objetivos específicos	23
4.3 Metas.....	23

Capítulo 5. Materiales y métodos	24
5.1 Materiales, reactivos y equipos	24
5.1.1 Material	24
5.1.2 Equipo	24
5.1.3 Reactivos	24
5.2 Métodos	25
5.2.1 Biosensor	26
Capítulo 6. Resultados	32
Capítulo 7. Discusión de resultados.....	42
Capítulo 8 Conclusiones	46
Referencias	47

Lista de tablas

1) Algunos estudios sobre el uso de biosensores para la detección de agentes virales.....	12
2) Uso de biosensores para la detección de agentes bacterianos.	15
3) Condiciones de medición.....	31
4) Parámetros voltamperométricos.....	36
5) tiempo de vida de algunos biosensores electroquímicos.....	44

Lista de abreviaturas

DSP: Ditiobisuccinimidil propionato

PBS: Buffer fosfato salino

H1: Hemaglutinina 1

Anti-H1: Antihemaglutinina 1

µg: microgramos

µL: microlitros

mL: mililitros

mM: milimolar

Lista de figuras

1) Virus de la influenza.....	5
2) Ejemplo de designación de virus de la influenza.....	6
3) Ciclo de vida del virus de la influenza.....	7
4) Tipos de biosensores modificado de Caygill <i>et al</i>	10
5) Estructura general de un biosensor.....	11
6) Estructura de un biosensor electroquímico Ronkainen <i>et al</i> ...	18
7) Ecuación de Nerest.....	20
8) Voltamperograma típico del par redox ferro/ferricianuro.....	21
9) Voltamperograma de Tang <i>et al</i>	22
10) Esquema del proceso de análisis de un biosensor.....	25
11) Laminilla de electrodos marca DropSens.....	26
12) Esquema general de la reacción entre el oro y los tiloles...	27
13) Estructura general de un anticuerpo.....	28
14) Voltamperogramas (potencial vs corriente) correspondientes a los controles.....	32
15) Voltamperogramas (potencial vs corriente) correspondientes a los ensayos a diferentes concentraciones de hemaglutinina 1.....	33
16) Voltamperogramas (potencial vs corriente) correspondientes a los ensayos a diferentes concentraciones de hemaglutinina 1.....	34
17) Voltamperograma del control negativo Laminilla con DSP+ Anticuerpo + BSA + Suero sano.....	35

18) Voltamperogramas de los electrodos con suero al que se le añadió antígeno.....	35
19) Blanco. Electrodo solo.....	38
20) Electrodo con DSP.....	38
21) Electrodo con DSP + Anticuerpo.....	39
22) Electrodo con DSP + BSA.....	39
23) Electrodo con Antígeno 10 µg/mL.....	40
24) Electrodo con Antígeno 1 µg/mL.....	40
25) Electrodo con Antígeno 0.1 µg/mL.....	41

Resumen

A lo largo de los años, las enfermedades infecciosas han representado un grave problema de salud pública, por lo que es importante un diagnóstico oportuno de estas.

La influenza es una enfermedad respiratoria causada por un virus perteneciente a la familia *Orthomyxoviridae* y se divide en tres tipos; A, B y C; siendo el tipo A el que más afecta a los seres humanos. Los virus influenza se componen de varias proteínas destacando la hemaglutinina (H) y la neuroanimidasa (N). Es importante mencionar que existen diferentes tipos de estas proteínas superficiales que se combinan entre sí dando como resultado diferentes subtipos de virus influenza tipo A, de los cuales se hizo enfoque en el virus influenza A H1N1.

De los diferentes métodos de detección de agentes virales se encuentran los biosensores que son dispositivos analíticos basados en la afinidad, en los cuales un elemento biológico inmovilizado se une selectivamente a la molécula de interés, provocando una respuesta medible, ya sea en la conductividad, en el pH, etc.

La metodología consistió en la inmovilización del anticuerpo anti-H1 en la superficie de un electrodo de oro, para posteriormente llevar a cabo la reacción antígeno-anticuerpo primero con la proteína pura y luego en suero humano; además de tener controles de cada paso del proceso. Finalmente se procedió a

evaluar dicha reacción en el biosensor por voltamperometría, sumergiendo al electrodo en una solución con un par redox y conectándolo a un potenciostato.

Los resultados indican conforme se va modificando la superficie del electrodo, la transferencia de electrones entre la solución y el electrodo se perturba, lo que se manifiesta con la reducción de los picos en los voltamperogramas, además de que dicha respuesta es dependiente a la concentración del antígeno.

Con base en los resultados obtenidos se concluye que el biosensor desarrollado es capaz de detectar H1, así como discriminar entre el antígeno y otras proteínas presentes en la matriz.

MARCO TEÓRICO

Capítulo 1 Introducción

Los microorganismos patógenos (bacterias, protozoarios, hongos y levaduras), así como otros agentes infecciosos como los helmintos, virus y los priones, son agentes causales de enfermedades infecciosas, las cuales a lo largo de la historia han representado un grave problema de salud pública a nivel mundial por lo que es importante un diagnóstico rápido y oportuno para que se pueda administrar un tratamiento adecuado. En este trabajo se hará enfoque en la detección del virus de la influenza, específicamente de la influenza A H1N1 mediante el desarrollo de un biosensor, los cuales son dispositivos basados en la afinidad con al menos un componente de naturaleza biológica diseñados para detectar un componente biológico, como pueden ser proteínas, enzimas, material genético como ADN o ARN etc., y que han demostrado ser prometedores para la detección de agentes patógenos como bacterias y virus. Se va a hacer enfoque en los biosensores electroquímicos, los cuales consisten en un conjunto de electrodos en los cuales se lleva a cabo la reacción específica como puede ser una reacción entre un antígeno (analito) con su respectivo anticuerpo; dicha reacción se puede detectar como una respuesta medible mediante técnicas electroquímicas, específicamente voltamperometría, viendo diferencias en el potencial del electrodo cuando se coloca en una solución con un par redox.

En este trabajo se mencionan las características de los biosensores electroquímicos y el desarrollo de uno para la detección del virus de la influenza

tipo A H1N1, la cual es una enfermedad común en México, y no ha habido el enfoque suficiente a la detección este subtipo del virus mediante el uso de biosensores, es menester mencionar que estos tampoco se encuentran muy integrados entre los métodos de diagnóstico en el país, y se espera que este proyecto pueda sentar las bases para su aplicación debido a que son rápidos y sensibles además de que se pueden utilizar en el punto principal de atención.

Capítulo 2 Agente patógeno

1.1 Virus influenza

La influenza es una enfermedad respiratoria aguda capaz de causar graves pandemias que pueden resultar en una gran morbilidad y mortalidad, es causada por un virus que pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*. De acuerdo con las diferencias antigénicas en la proteína de la matriz (M) y la nucleoproteína (NP), este virus puede clasificarse en tres grupos conocidos como el virus de influenza A, el virus de la influenza B y el virus de la influenza C. Entre ellos, los virus tipo A son los más contagiosos y los que causan alta mortalidad a la población debido presentan variaciones antigénicas. Dichas variaciones están determinadas por la recombinación genética y son las responsables de las pandemias que azotaron el mundo en 1918, 1957, 1977 y 2009. Teniendo en cuenta la estructura del virus de influenza A, se podría afirmar que es un virus de ARN monocatenario negativo que contiene ocho segmentos. Cada segmento de ARN codifica al menos una proteína y la proteína de la matriz M1 encapsula el genoma englobado. El ARN en el que está constituido el genoma está compuesto por el complejo de nucleoproteína y polimerasa trimérica que incluye proteínas PB1, PB2 y PA. Las

proteínas más importantes son la hemaglutinina (HA) (72 kDA) y la neuraminidasa (NA) las cuales son las dos glicoproteínas que interactúan con las moléculas celulares. También hay una proteína de canal de protones M2 que proporciona el transporte de protones a través de la membrana viral. Estas estructuras de ARN-proteína están rodeadas por una envoltura de lipoproteína. En la figura 1 se puede apreciar una imagen de la estructura del virus de la influenza [Vargas 2016 y Krejcova 2012].

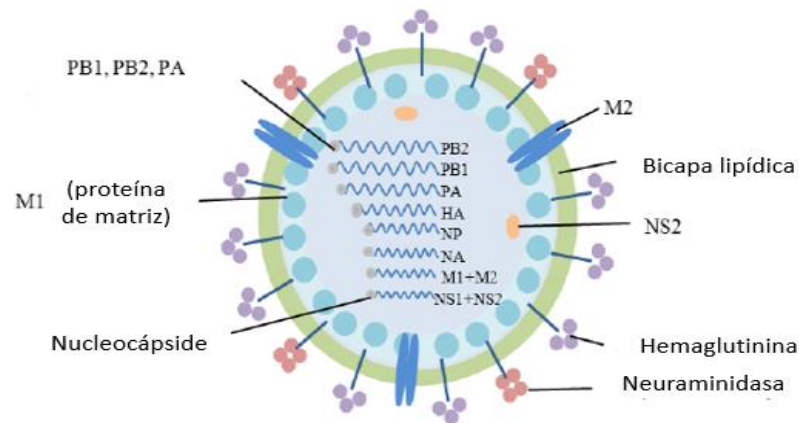


Figura 1. Virus de la influenza. Fuente: Krejcova *et al* 2012. M1 permanece dentro mientras que M2, HA y NA están presentes en la superficie externa de la partícula viral

Para los virus influenza de tipo A existen diecisiete subtipos de hemaglutinina (H1, H2, H3...H17) y diez subtipos de neuraminidasa (N1, N2...N10). Los virus influenza son designados, entre otros, con base en los subtipos de dichas proteínas que presenten (un ejemplo de designación de virus influenza se observa en la Figura 2). [Tapeli 2018].

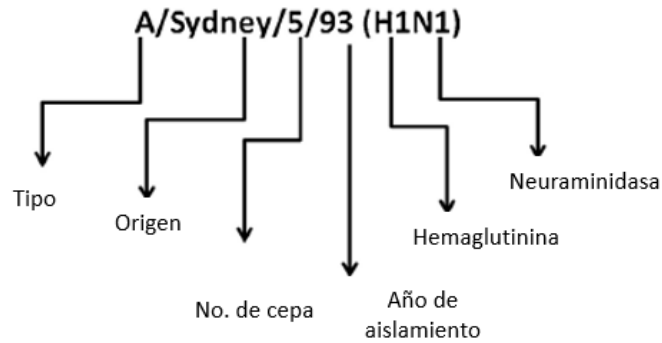


Figura 2. Tapeli *et al* 2018. Ejemplo de designación de virus de la influenza. Se trata de un tipo de virus influenza tipo A, aislado en Sydney, se trata de la cepa número 5 aislada en el año 1993 y finalmente, en su superficie tiene hemaglutinina 1 y neuraminidasa 1.

La unión del virón a la célula hospedera se realiza por dominios globulares en la hemaglutinina viral con receptores que poseen el ácido siálico o neuramínico unido a residuos de galactosa por enlace α -2-6 presente en las glicoproteínas de membrana de células del epitelio respiratorio. Después de la unión, el virus entra a la célula por endocitosis. Luego del desnudamiento de la partícula viral se liberan los ocho segmentos de ARN viral, los cuales migran al núcleo de la célula hospedera [Vargas 2012]. La segunda fase del ciclo replicativo se inicia con la síntesis del ARNm poliadenilado de las proteínas M2, NA, HA, M1 y NS2. La HA se sintetiza y, en forma cotranslacional, se pliega a su configuración globular. La estructura proteica es estabilizada por puentes disulfuro, se une a otros oligómeros de HA para formar homotrímeros y sufre clivajes proteolíticos que forman los dos dominios reconocimiento y el dominio de fusión. Las proteínas glicosiladas llegan a la membrana plasmática asistidas por la proteína M1 para

The diagram illustrates the six steps of the Influenza Virus Replication Cycle within an epithelial cell:

- Attachment:** Influenza virus particles attach to sialic acid receptors on the cell surface.
- Entry:** The virus enters the cell. NA (neuraminidase) cleaves receptors, allowing virus release.
- Uncoating:** The virus releases its RNA and proteins into the cytoplasm.
- Protein Synthesis:** The M2 channel protein is synthesized and inserted into the endoplasmic reticulum membrane.
- RNA Synthesis:** The viral RNA is transcribed into mRNA in the nucleus, which is then translated in the cytoplasm.
- Release:** New virus particles are released from the cell.

Key components and processes shown include:

- Endocytosis & Fusion:** The virus enters via endocytosis and fuses with the endosomal membrane.
- M2 Channel Protein:** A transmembrane protein that forms a channel for protons to enter the nucleus.
- Nucleus:** Site of viral RNA synthesis and transcription.
- Major histocompatibility protein complex:** Consists of MHC1, MHC2, PA, and NP.

Varias proteínas virales se han asociado con su patogenicidad como es el caso de la proteína HA la cual determina la unión al receptor, la antigenicidad y el tropismo, esta característica se encuentra en un residuo polibásico de aminoácidos localizado en el sitio de clivaje proteolítico. En el virus de la influenza la proteína HA puede ser un factor de virulencia cuando presenta múltiples sitios de proteólisis que facilitan la formación de la proteína en múltiples tejidos, potencializando la cinética de replicación. Otros factores no virales asociados con la severidad del cuadro clínico son los factores del hospedero: edad y presencia

de comorbilidades como obesidad, diabetes, asma, enfermedad obstructiva crónica, cardiopatías, infección por virus de inmunodeficiencia humana, segundo o tercer trimestre del embarazo, y factores del medio ambiente [Vargas 2012, Tapeli 2018].

2.2 Detección

La detección rápida y de bajo costo de los virus de la influenza es de gran interés, sin embargo, los métodos más utilizados para la detección de virus son laboriosos, lentos, caros, necesitan instalaciones especializadas y personal capacitado, etc.

Entre estos métodos se puede mencionar, por ejemplo, las pruebas rápidas para detección de antígenos (RAD), cuya sensibilidad depende de la calidad de la muestra, el tipo de virus, la cantidad de virus, el período de enfermedad y los métodos de recolección de muestra. La sensibilidad que se obtiene con RAD para H1N1 cae de 40% a 60%. Otro método diagnóstico es cultivo de virus en cultivo celular, donde se usan principalmente para el aislamiento de virus las primarias de rhesus monkey (PMK) o Madin-Darby canine kidney (MDCK), este es considerado el “estándar de oro” a la hora de llevar a cabo el diagnóstico de infecciones virales por su alta selectividad, sin embargo tienen como desventaja que su utilidad es limitada debido a la duración de 48 h como mínimo para obtener un resultado, y que por lo tanto su uso es imposible para los casos de emergencia.

También encontramos la inmunofluorescencia, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), basada en la detección del material genético del virus,

mediante este método se obtienen resultados en aproximadamente 6 horas, y se suelen aplicar en caso de que los resultados de RAD sean negativos, enzimoimmunoanálisis (ELISA) y métodos serológicos [Lin 2015, Hassen 2011].

Capítulo 3 Biosensores

3.1 Generalidades

El método diagnóstico en el cual se va a enfocar este proyecto son los biosensores. Un biosensor es un dispositivo para el análisis compuesto de un transductor y al menos, un componente de naturaleza biológica (por ejemplo, un anticuerpo, una enzima etc.) los cuales están basados generalmente en la afinidad, es decir, usan un elemento biológico inmovilizado que se une selectivamente a la molécula que se detecta, el objetivo o el analito, para detectar un cambio en una superficie localizada.

Este cambio puede medirse de varias formas de manera que existen biosensores que requieren luz, usan movimiento mecánico, usan partículas magnéticas, etc. Los biosensores están diseñados para detectar y en algunos casos también cuantificar una molécula bioquímica, como una secuencia de ADN o una proteína particular (por ejemplo, un antígeno). [Hassanpour 2018, Caygill 2010].

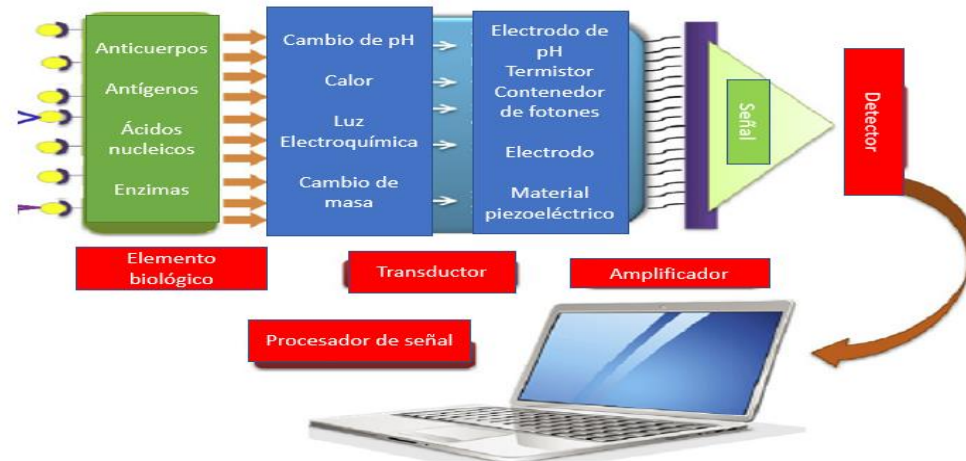


Figura 4. Componentes de biosensores modificado de Caygill *et al.* Se observan elementos biológicos que se pueden inmovilizar, diferentes formas de medición y sus respectivos transductores.

Un biosensor típico contiene dos elementos principales (figuras 4 y 5):

- El primero consiste en un elemento de reconocimiento, el cual permite diferenciar al analito de la matriz de la muestra.
- El segundo es el transductor, es decir, el dispositivo que produce una señal; la cual es recopilada, amplificada y mostrada por un procesador de señales. Dicha señal puede medirse de distintas maneras dependiendo del transductor; de manera que existen biosensores que miden cambios de temperatura, cambios de haces de luz, cambios en el pH, cambios en parámetros electroquímicos, etc. [Krejčová 2012, Caygill 2010].

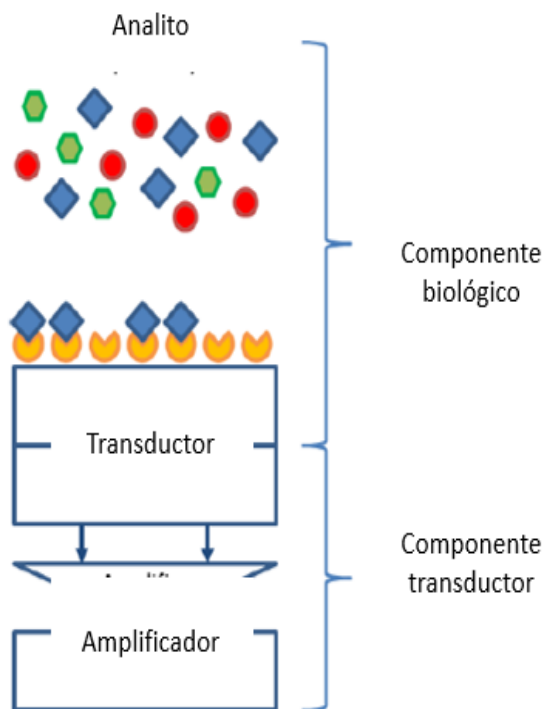


Figura 5. Estructura general de un biosensor. Fuente: Krejcova *et al.*
Se observa que están compuestos por un transductor y un componente biológico.

3.2 Antecedentes de los biosensores

El primer sensor estaba basado en enzimas y fue informado por Updike y Hicks en 1967. Los biosensores enzimáticos se han ideado en métodos de inmovilización, es decir, adsorción de enzimas por fuerzas de Van der Waals, enlaces iónicos o enlaces covalentes. Las enzimas comúnmente usadas para este propósito son oxidorreductasas, polifenol oxidasas, peroxidasas y aminooxidasas. El primer sensor basado en microorganismos o basado en células fue actualizado por Diviès en 1975. Los inmunosensores se establecieron sobre el hecho de que los anticuerpos tienen alta afinidad hacia sus respectivos antígenos. [Daniels 2007].

3.2.1 Agentes virales

Existen varios estudios previos relacionados con el uso de los inmunobiosensores como método de diagnóstico de agentes virales; algunos de ellos se observan en la tabla 1

Tabla 1. Algunos estudios sobre el uso de biosensores para la detección de agentes virales.

Año	Virus	Tipo de biosensor	Autor/recopilador
1996	Virus de inmunodeficiencia humana (VIH)	Electroquímico	Wang <i>et al</i>
2012	Dengue	Electroquímico (voltamperometría)	Rai <i>et al</i>
2014	Virus de la hepatitis	Electroquímico	Yao <i>et al</i>
2012	Influenza A H5N1	Óptico (Resonancia de Plasmón superficial)	Bai <i>et al</i>
2007	Influenza A	Gravimétrico	Owen <i>et al</i>
2013	Influenza A H5N1	Electroquímico	Zhang <i>et al</i>
2012	Influenza A H5N1	Electroquímico	Lum <i>et al</i>
2012	Influenza A H5N1	Electroquímico	Malecka <i>et al</i>
2011	Influenza A H5N1	Electroquímico	Hassen <i>et al</i>
2008	Influenza A H5N1	Electroquímico	Diouani <i>et al</i>
2015	Influenza A H5N1	Electroquímico	Lin <i>et al</i>
2018	Influenza A H3N2	Electroquímico	Tapeli <i>et al</i>
2018	Influenza A H5N1	Electroquímico	Tapeli <i>et al</i>
2010	Influenza A H1N1	Óptico	Chang <i>et al</i>
2010	Influenza A H1N1	Reflectométrico	Endo <i>et al</i>

Haciendo enfoque en algunos estudios mencionados en la tabla anterior; en un estudio realizado por Wang *et al* en 1996 con la finalidad de detectar al virus de la inmunodeficiencia humana detectando secuencias cortas de ADN relacionadas

con dicho virus dando como resultado un límite de detección de 4×10^{-9} M de segmentos de HIV.

Otro ejemplo es el estudio realizado por Rai *et al* en 2012 donde se utilizaron para detectar al virus del dengue. Se utilizó un biosensor de ADN a base de membrana de alúmina nanoporosa utilizando sondas de ADN inmovilizadas obtenidas mediante PCR sobre las paredes del canal de alúmina el cual presentó un con un límite de detección ultrasensible de 9.5×10^{-12} M.

En cuanto al virus de la influenza, un estudio realizado por Bai *et al* 2012 utilizó un biosensor portátil de Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR) para detectar el virus de la influenza aviar (VIA) H5N1. Se pudo detectar el VIA H5N1 en muestras de saliva de aves de corral utilizando este biosensor en 1.5 horas.

En otro estudio involucrado publicado en 2007 por Owen *et al* donde se detectó partículas del virus de la influenza A en aerosol de manera directa utilizando un sensor de microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) con anticuerpos de influenza A. Se estima que el límite de detección es de 4 partículas de virus / ml.

En 2018, Tapeli *et al* realizó una recopilación de estudios en los que se utilizaron biosensores electroquímicos para la detección de proteínas de virus influenza mediante diversos métodos, se menciona en la tabla 1 aquellos en los que se utilizó un electrodo de oro.

Este proyecto se va a enfocar en el virus de la influenza A H1N1 el cual ha sido objeto de diversos estudios para su detección por medio de los biosensores. Por ejemplo, un estudio realizado en 2010 por Chang *et al* en el cual se utilizó un

biosensor de fibra óptica dando como resultado que la detección de la proteína H1 en muestras clínicas se estimó un límite de detección de 13.9 pg/mL, que es 103 veces mejor que la prueba ELISA convencional cuando se usan los mismos anticuerpos.

En otro estudio publicado por Endo *et al* en 2010 se realizó la detección del virus de la influenza H1N1 en muestras de saliva humana mediante reflectometría utilizando anticuerpos inmovilizados de nano impresión flexible (NIL) con un biosensor de cristal fotónico bidimensional. Los resultados indicaron que es posible detectar los viriones de influenza presentes en la saliva humana (límite de detección: 1 ng/mL⁻¹).

Como se puede ver en los antecedentes sobre el uso de biosensores para el diagnóstico de virus de la influenza, la mayoría se enfocan en el virus A H5N1, por lo que aquí se va a hacer hincapié en el A H1N1 por ser más endémico de México que los demás tipos de virus influenza.

3.2.2 Agentes bacterianos

Además del uso de biosensores para el diagnóstico de agentes virales, también se han utilizado para la detección de antígenos bacterianos (Tabla 2)

Tabla 2. Uso de biosensores para la detección de agentes bacterianos

Año	Bacteria	Tipo de biosensor	Autor/recopilador
2016	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Electroquímico	Diouani <i>et al</i>
2017	<i>Escherichia coli</i>	Electroquímico	Idil <i>et al</i>
2013	<i>Escherichia coli</i>	Electroquímico	Barreiros dos Santos <i>et al</i>
2008	<i>Salmonella typhimurium</i>	Electroquímico	Nandakumar <i>et al</i>
2012	<i>Listeria innocua</i>	Electroquímico	Braiek <i>et al</i>

Tal es el caso del estudio realizado por Diouani *et al* en 2016 detectándose la proteína bacteriana ESAT-6 perteneciente a la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* mediante una reacción antígeno-anticuerpo utilizando el anticuerpo monoclonal anti-ESAT-6, lo que puede dar como resultado avances importantes en el diagnóstico exitoso de la tuberculosis.

Escherichia coli es otra bacteria para la que también se han desarrollado biosensores para su detección, como ejemplo se puede mencionar el estudio realizado por Idil *et al* en 2017. La metodología consistió en que se incubó a la bacteria para finalmente detectar células completas de la misma, esto con una sensibilidad de 70 UFC/mL. Otro estudio en el cual se llevó a cabo la detección de *E. coli* es el realizado por Barreiros dos Santos *et al* en 2013, en el cual se utilizó la técnica de formar SAMS en la superficie del biosensor para inmovilizar los anticuerpos y detectar a las bacterias mediante EIS con un límite de detección de 2 UFC/mL.

Se han detectado otras bacterias mediante el uso de biosensores, algunas de ellas son *Salmonella typhimurium* en el estudio realizado por Nandakumar *et al* 2008 donde se utilizó un biosensor de impedancia para detectar la concentración de la bacteria en una muestra de concentración conocida dando un resultado muy preciso de 500 UFC/mL en un tiempo muy corto de aproximadamente 6 minutos; también es menester mencionar el estudio realizado por Tolba *et al* 2012 para detectar la bacteria *Listeria innocua* mediante EIS en una muestra intencionalmente contaminada. En el año 2012 Braiek *et al* desarrollaron un inmunobiosensor que fue capaz de detectar a la bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mediante EIS con un límite de detección de 10 UFC/mL.

3.2.3 Selectividad

En la mayoría de los casos mencionados se probó la selectividad del biosensor intentando detectar otras bacterias como puede ser el caso de *Salmonella typhimurium* en el estudio de Barreiros dos Santos, Tolba también probó la selectividad de su biosensor utilizando *E. coli* y finalmente en el estudio realizado por Braiek se probó la sensibilidad del sensor con las bacterias *E. coli* y *S. epidermidis*.

En el estudio de Diouani se hizo algo similar, sin embargo, en lugar de probar la selectividad del inmunobiosensor desarrollado contra otras bacterias, se probó contra otra proteína presente en la bacteria, Ag85b que también es reconocida como antígeno. Para ninguno de los casos las bacterias o proteínas adicionales supusieron un problema; ya que no se obtuvieron resultados significativos luego

de la modificación de la superficie, confirmando la eficiencia y selectividad de los métodos basados en reacciones antígeno-anticuerpo

3.2.4 Versatilidad

Además, es menester mencionar que, aunque los virus y las bacterias son muy distintos entre sí, sin embargo, la metodología para su detección es muy similar por lo que el diseño del biosensor se puede extrapolar a otros agentes patógenos siempre y cuando se cuente con el anticuerpo pertinente.

3.3. Biosensores electroquímicos

Son aquellos en los que el transductor es un conjunto de electrodos, por lo general se utilizan de dos a tres electrodos (un electrodo de trabajo, uno de referencia y se puede utilizar un contraelectrodo; suelen ser de oro y plata debido a sus excelentes propiedades eléctricas y mecánicas) y debido a su bajo costo, baja potencia y facilidad de miniaturización, y el hecho de que puedan enfocarse para aplicaciones donde minimizar el tamaño de equipo y el costo es crucial, como el diagnóstico de un agente patógeno en el punto central de atención, son de los biosensores más prometedores debido a que dependen únicamente de la medición de las corrientes y / o voltajes para detectar la unión del anticuerpo con el antígeno. [Daniels 2007, Ronkainen 2010].

Las técnicas electroquímicas estudian las propiedades eléctricas de una disolución en la llamada “célula electroquímica”. Algo que caracteriza a las técnicas electroquímicas es que no miden concentraciones si no actividades por lo que es importante considerar la presencia de interferencias [Gómez-Biedma 2002].; en este caso las interferencias no deben suponer un problema en la

medición de la actividad eléctrica ya que el analito es un antígeno que se debe unir específicamente al anticuerpo previamente fijado en la superficie del electrodo de trabajo, de manera que las diferencias en el potencial entre un electrodo con el analito y uno sin este en teoría debe deberse solamente a la reacción antígeno-anticuerpo.

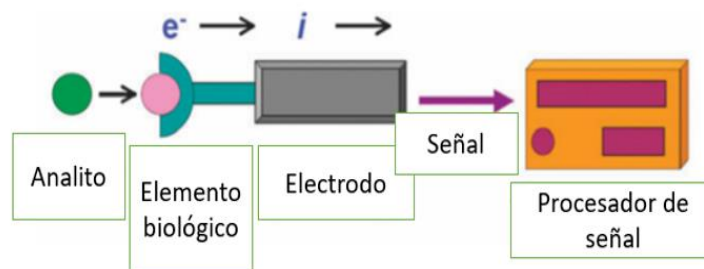


Figura 6 Estructura de un biosensor electroquímico Ronkainen *et al.* El transductor es un electrodo al que se une el elemento biológico.

Estos se pueden subdividir todavía más en función de cómo se realice la medición eléctrica, incluidos los sensores voltamperométricos, potenciométricos coulométricos y de impedancia. Los potenciométricos se basan en la relación entre la fuerza motriz externa y la actividad del analito, los coulométricos en la cantidad de carga empleada y la concentración del analito, la impedancia se basa en una relación entre el cambio en el voltaje y el cambio resultante en la corriente, y finalmente, la técnica de medición electroquímica en la que va a estar enfocada este proyecto es la voltamperometría la cual se basa en la relación entre la intensidad de la corriente y el voltaje aplicado en la celda. [Ronkainen 2010, Caygill 2010].

3.4. Voltamperometría

La voltamperometría es una técnica en la cual se obtiene información tanto cinética como termodinámica de las curvas intensidad-potencial (i - E). Es decir, que determina directamente la velocidad a la cual se produce una reacción sobre un electrodo (reacciones de transferencia electrónica), ya que mide la corriente i en cada instante; se basan en la alteración continua del potencial que se aplica a la solución a través del electrodo, conjugado con la medición de la corriente resultante. En la voltamperometría se mide la intensidad de la corriente en función del potencial, voltaje o señal de excitación aplicado en condiciones para favorecer la polarización del electrodo de trabajo; se aplica un potencial en dicho electrodo de trabajo y finalmente se mide la corriente. Dicha corriente es el resultado de la electrólisis por medio de una reducción u oxidación electroquímica en el electrodo de trabajo de manera que la corriente de electrólisis se limita por la tasa de transporte de masa de las moléculas al electrodo. [Chen 2013, Malecka 2012].

Algunos de los métodos de voltamperometría más importantes incluyen: voltamperometría de barrido lineal, voltamperometría cíclica, voltamperometría hidrodinámica, voltamperometría de pulso diferencial, voltamperometría de onda cuadrada, voltamperometría de decapado, etc.

La técnica que se utilizará en este proyecto es la voltamperometría cíclica (CV). En un experimento de CV la diferencia de potencial eléctrico aplicada entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia varía linealmente entre un valor inicial (potencial inicial) y un valor límite (primer potencial de giro). En este punto

el sentido del barrido del potencial cambia hasta que el potencial vuelve al valor inicial, o bien a otro potencial distinto. Durante el barrido del potencial se registra la corriente eléctrica que circula por la celda electroquímica y que está asociada, entre otros, a procesos de reducción u oxidación que tienen lugar en el electrodo de trabajo. [Bagotsky 2005, Daniels 2007].

La celda electroquímica incluye también un contraelectrodo electrodo cuya función es conseguir que la corriente circule entre este y el electrodo de trabajo evitando que pase por el electrodo de referencia y por tanto que se polarice, debido a que su potencial debe ser constante en todo momento. [Bagotsky 2005, Daniels 2017].

El comportamiento observado en un voltamperograma del par redox se debe al equilibrio de dichas especies; el cual es explicado por la ecuación de Nerest que relaciona el potencial de una celda electroquímica (E) con el potencial estándar de una especie (E^0) y las actividades relativas del analito oxidado (Ox) y reducido (Red) en el sistema en equilibrio.

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{(Ox)}{(Red)} :$$

Figura 7 Ecuación de Nerest. Donde R: Es la constante universal de gases, T: es la temperatura, n es el número de electrodos y F es la constante de Faraday

Dicha ecuación proporciona información valiosa para predecir cómo responderá un sistema a un cambio de concentración de especies en solución o un cambio en el potencial del electrodo (Elgrish et al 2018)

La voltamperometría se utiliza para aquellas técnicas en las que el potencial se escanea en un rango de potencial establecido. La respuesta suele verse en una gráfica llamada voltamperograma cíclico, el cual es una resultante corriente vs. potencial, (ver figuras 8 y 9). [Tang 2006].

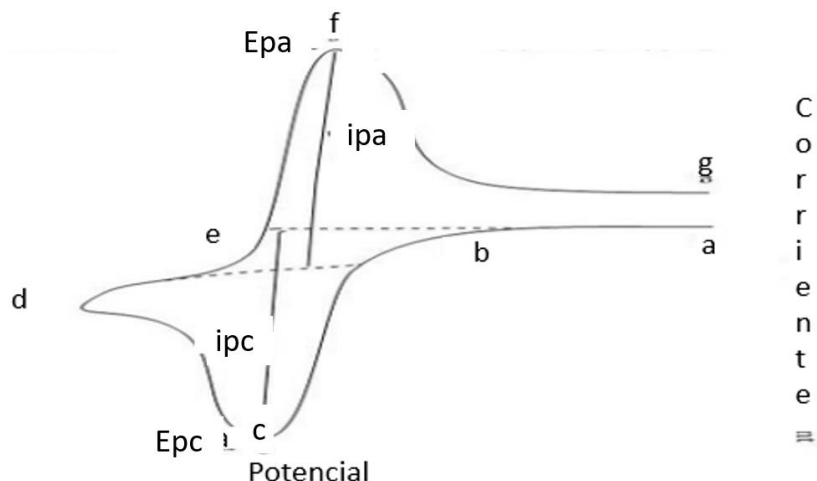


Figura 8 Voltamperograma típico de un par redox (Reducción a la izquierda y oxidación a la derecha según la IUPAC). Se inicia con el proceso de reducción que ocurre desde el potencial inicial (a) al potencial de conmutación (d). En esta región, el potencial se escanea negativamente para causar una reducción. La corriente resultante se llama corriente catódica (i_{pc}). El potencial correspondiente se produce en (c), y se denomina potencial catódico (E_{pc}). El E_{pc} se alcanza cuando todo el sustrato en la superficie del electrodo se ha reducido. Una vez que se ha alcanzado el potencial de conmutación (d), el potencial explora positivamente de (d) a (g). Esto da lugar a la corriente anódica (i_{pa}) y la oxidación

a ocurrir. El potencial en (f) se denomina potencial anódico (E_{pa}) y se alcanza cuando todo el sustrato en la superficie del electrodo se ha oxidado.

A partir de estos datos se pueden obtener diferentes parámetros como el potencial redox $E^{0'} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2}$, la relación pico-corriente $= \frac{i_{pa}}{i_{pc}}$, la diferencia de potencial $\Delta E = E_{pc} - E_{pa}$ y finalmente, como parámetro más importante en este caso para determinar si existe diferencia en los picos de corriente de reducción (i_{pc}) en los voltamperogramas luego de modificar la superficie del electrodo $\Delta i_{pc} = i_{pc_0} - i_{pc_{muestras}}$

(Quiroga 2019, Bhradwaj et al 2019).

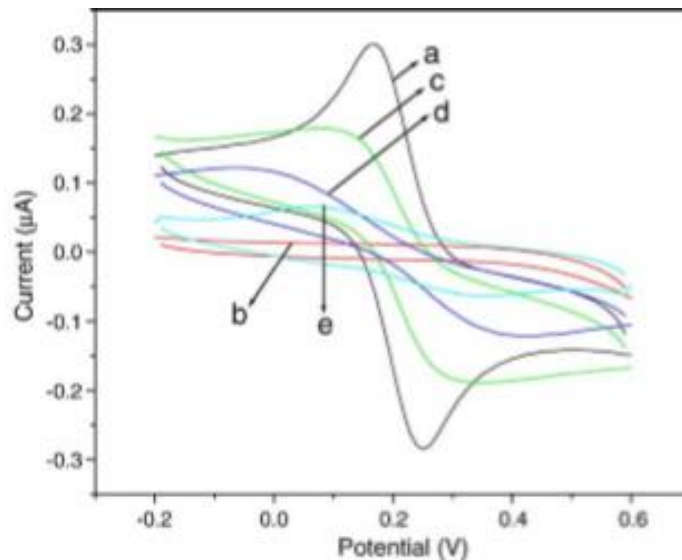


Figura 9. Voltamperograma de Tang *et al* se observa el voltamperograma de a) un electrodo sin modificar, b) Electrodo con inmovilizador, c) electrodo con inmovilizador y nanopartículas de oro, d) electrodo con inmovilizador y anticuerpo y finalmente e) electrodo luego de la reacción antígeno-anticuerpo.

Capítulo 3. Hipótesis

La proteína hemaglutinina 1 del virus de la influenza A H1N1 es detectada por un inmunobiosensor electroquímico por voltamperometría.

Capítulo 4. Objetivos y metas

4.1 Objetivo general

Desarrollar un inmunobiosensor electroquímico por voltamperometría que sea capaz de detectar la proteína hemaglutinina 1 del virus de la influenza A H1N1

4.2 Objetivos específicos

- 1) Modificar la superficie del electrodo para la inmovilización de anticuerpos
- 2) Evaluar la reacción antígeno-anticuerpo en el biosensor por voltamperometría
- 3) Detectar la proteína H1 en suero humano mediante la reacción antígeno-antígeno en el biosensor por voltamperometría

4.3 Metas

- 1) Obtener el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada
- 2) Presentar el trabajo en un congreso nacional y/o internacional

Capítulo 5. Materiales y métodos

5.1 Materiales, reactivos y equipos

5.1.1 Material

Micropipetas de 2-20 μL , 20-200 μL y 100-1000 μL

Tubos cónicos

Gradilla de tubos cónicos

Espátula

Vidrio de reloj

Caja de Petri

Sanitas

Palillos de madera

5.1.2 Equipo

Electrodos de oro con contra electrodo de oro y electrodo de referencia de plata.

Marca Dropsens

Potencioestato galvanostato. Marca Metrohm. Disponible en: Laboratorio de instrumentación analítica

Regulador de voltaje-potenciómetro Marca: Everchap

5.1.3 Reactivos

Hemaglutinina comercial. Marca: Abcam

Anti-Hemaglutinina comercial. Marca: Abcam

Albúmina sérica bovina

Buffer de fosfatos (PBS) 10mM pH 7.4

Ditiobisuccinimidil propionato (DSP)

Hidróxido de sodio 1 M

Ácido clorhídrico 1 M

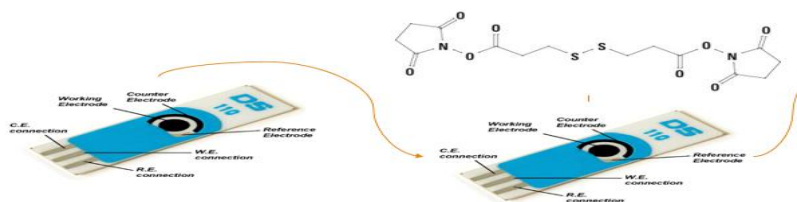
Acetona absoluta

Agua desionizada

5.2 Métodos

Nuestro proceso de medición consta de varios pasos, los cuales se describen a continuación (ver figura 13, la cual muestra un ejemplo de biosensor electroquímico el cual está basado en parte nuestro proyecto)

- 1) Adición del inmovilizador a la superficie del biosensor
- 2) Adición e inmovilización de los anticuerpos
- 3) Adición de albúmina sérica bovina
- 4) Adición de los antígenos
- 5) Evaluación de la respuesta dada debida a la reacción antígeno-anticuerpo.



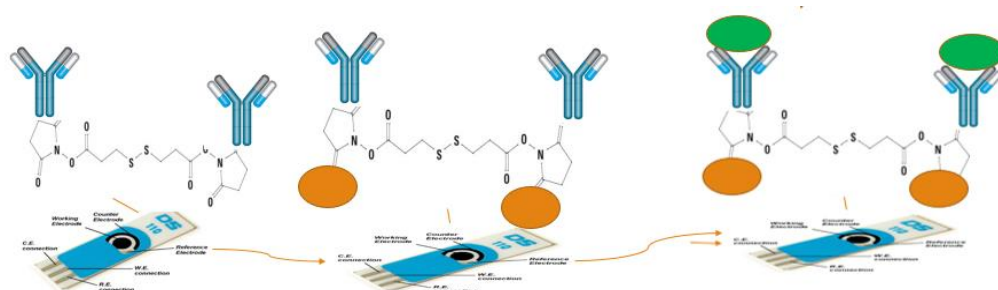


Figura 10. Esquema del proceso de análisis de nuestro biosensor. Luego de la adición del DSP, se inmoviliza el anticuerpo, posteriormente se bloquean los sitios con BSA (naranja) y finalmente se añade el antígeno (verde)

5.2.1 Biosensor

5.2.1.1 Modificación de la superficie

La parte transductora del biosensor consiste en una laminilla de tres electrodos (un electrodo de trabajo de oro, cuyo potencial dependerá del potencial del analito, un electrodo de referencia de plata con potencial constante y un contraelectrodo de oro, que ayudará a mantener constante el potencial del electrodo de referencia). [Zhang 2013].

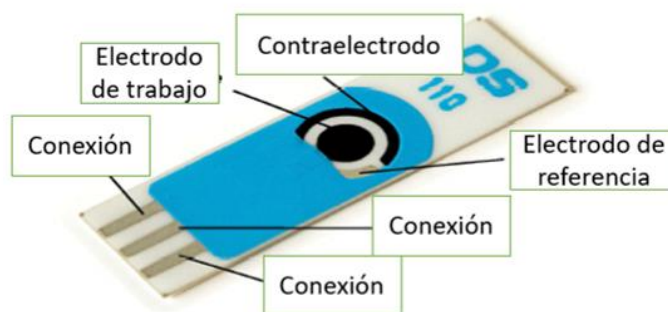


Figura 11. Laminilla de electrodos marca DropSens. Permite manejar volúmenes en microlitros

El electrodo de trabajo se puso en contacto durante 1 hora a 4°C en cámara húmeda, en una solución de acetona que contiene ditiobissuccinimidil propionato (DSP) 1Mm. Las moléculas de tiol se adsorben sobre la superficie del metal y, gracias a las interacciones intermoleculares, forman estructuras altamente organizadas en la superficie del oro posteriormente, se lava la superficie para eliminar las moléculas de tiol libre. La reacción formal de adsorción puede escribirse de la siguiente manera:

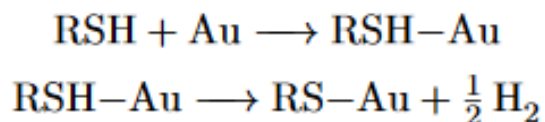


Figura 12. Esquema general de la reacción entre el oro y los tioles. En la primera etapa, las moléculas de tioles (RSH) se adsorben sobre la superficie de Au y luego pierden el átomo de H del grupo tiol, generando el radical tiil (RS) para formar una unión (S-Au). Este es considerado un enlace covalente. [Pensa 2011, Frederix 2003].

Luego de eso se añadió una solución de 0.1 µg / ml de anti-H1 en buffer de fosfatos (PBS) y un pH de 7.4. Incubar 16 horas en una cámara húmeda a 4°C. El DSP es, además, capaz formar enlaces cruzados entre especies bio-catalíticas o proteínas; el proceso se conoce como co-reticulación, ya que crea matrices complejas que hacen posible la inmovilización de los anticuerpos sobre la superficie modificada que se logra debido a que el tiol contiene grupos terminales con N-hidroxi-succinimida; (NHS) activos en su estructura, por lo que es capaz formar enlaces amida por sí mismo con las aminos primarias de los anticuerpos;

aunque también es posible usar tioles con grupos carboxílicos terminales como el ácido 16-mercaptohexanodecanóico; el grupo carboxílico terminal puede reaccionar con aminas primarias por medio de una reacción de condensación para producir los ya mencionados enlaces amida. Para este fin generalmente se usa una carbodiimida soluble en agua en conjunto con N-hidroxi-succinimida; (NHS). Después de formar un compuesto intermedio con el resto carboxílico, el grupo éster activo es reactivo hacia aminas primarias.

De esta manera los grupos éster terminales activos forman enlaces amida entre estos y la región Fc de los anticuerpos (ver figura 12), permitiendo que la región Fab (la región donde se produce unión al antígeno) esté orientada fuera de la superficie del electrodo, lo que resulta en un eficiente enlace anticuerpo-antígeno.

[Diouani 2015, Jazayeri 2016]

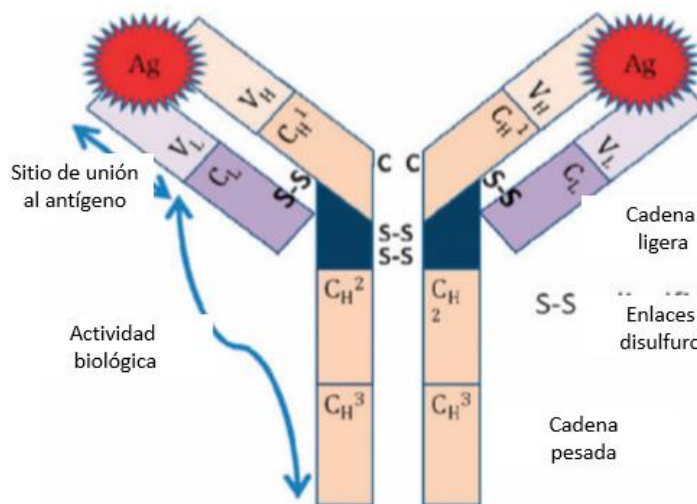


Figura 13. Estructura general de un anticuerpo. La unión entre el anticuerpo y el electrodo se da entre los grupos terminales del DSP y la cadena pesada; dejando libre el sitio de unión al antígeno.

Los anticuerpos no unidos se eliminan mediante tres lavados con PBS y con la finalidad de bloquear los sitios donde no se haya unido el anticuerpo con una solución de Albumina Sérica Bovina (BSA) al 1% (p / v) a 4° en cámara húmeda durante 1 hora para bloquear los sitios libres; evitando uniones inespecíficas. Se hará un lavado con PBS para eliminar excesos.

5.2.1.2 Adición de antígenos

Finalmente se lleva a cabo la reacción antígeno-anticuerpo añadiendo a los electrodos el antígeno H1 a diferentes concentraciones (0.01 µg / ml 0.1 µg / ml, 1 µg / ml y 10 µg / ml) para cada ensayo en buffer de fosfatos (PBS) y un pH de 7.4. Se incuba durante aproximadamente media hora a temperatura ambiente.

5.2.1.3 Controles

Con la finalidad de asegurar la validez de los resultados obtenidos se realizaron diversos controles de cada caso del proceso los cuales son los siguientes

1: Laminilla sola; no se le adicionó ningún reactivo

2: Laminilla con el reactivo DSP

3: Laminilla con el reactivo DSP y el anticuerpo

4: Laminilla con el reactivo DSP y BSA

De esta manera se comprobará que efectivamente existe un cambio en la corriente al llevarse a cabo la reacción antígeno-anticuerpo en los ensayos.

5.2.1.4 Ensayos de muestras “reales

Se obtuvo suero de un humano sano, y se utilizó para preparar muestras de suero con el antígeno a las mismas concentraciones que se utilizaron para las pruebas con las proteínas puras. Además de ello se utilizó suero sin que se le haya añadido antígeno como control de la matriz.

Se prepararon laminillas de forma normal, con la excepción de que se añadió suero con antígeno en lugar del antígeno puro y se contó con un control extra de matriz (en lugar de añadir suero con antígeno se añade únicamente suero del individuo sano)

5.2.1.5 Medición de voltamperometría

Las mediciones electroquímicas de voltamperometría se llevaron a cabo poniendo a los electrodos en contacto con una solución que contiene 5mM de $K_4[Fe(CN_6)]$ y 5mM $K_3[Fe(CN_6)]$ y conectándolos a un potencioestado galvanostato. Marca BAS que es controlado a través de una computadora con un software llamado Nova.

Las mediciones de voltamperometría se llevaron a cabo según las condiciones estipuladas en la tabla 3

Los datos de voltamperometría se representarán en una gráfica de potencial (v) contra corriente (A) en el software Nova 2.1.2

La corriente se mide en el electrodo de trabajo. Para establecer un voltaje deseado entre el electrodo de trabajo y la solución, se debe hacer contacto eléctrico con la solución usando un electrodo de referencia y / o contraelectrodo.

El electrodo de referencia mantiene un potencial eléctrico fijo y reproducible entre el contacto del metal y la solución, permitiendo que se aplique un voltaje conocido y el contraelectrodo suministra corriente a la solución para mantener el voltaje deseado de la solución del electrodo, generalmente en retroalimentación electrónica con el electrodo de referencia monitoreando el voltaje de la solución. La solución actúa de la siguiente manera: el ferricianuro que se encuentra en disolución se acerca al electrodo de trabajo donde tiene lugar la reducción, después el ferrocianuro se difunde hacia el seno de la disolución. Con cada modificación realizada en la superficie del biosensor dicha transferencia cambia, lo que permite medir la voltamperometría [Daniels 2007, Gomez-Bimeda 2002]. [Zhang 2013].

Tabla 3. Condiciones de medición

Parámetro	Valor
Voltaje	100 mv/s
Potencial	-0.5/0.5 v
Duración	30 segundos

Capítulo 6. Resultados

Los resultados de tanto controles (figura 13) como ensayos (figura 14) se observan en una gráfica de potencial (eje x) vs corriente (eje y), De estas medidas y de las subsecuentes se obtuvieron los datos de ΔE_{pc} , Potencial redox y Relación pico-corriente (tabla 4)

En cuanto a los controles se observa que el voltamperograma del electrodo sin modificar tiene comportamiento típico del par redox ferro/ferricianuro y que conforme se va modificando la superficie del electrodo dicho comportamiento se ve alterado, manifestándose en una disminución en la conductividad en los picos, principalmente el pico de reducción, primero siendo leve para el caso de los electrodos tratados con DSP ($\Delta I_{pc} = 4.55 \times 10^{-6}$) y anticuerpo ($\Delta I_{pc} = 4.28 \times 10^{-5}$) y finalmente luego de la adición del BSA $\Delta I = 3.02 \times 10^{-4}$. Esto confirma que la modificación de la superficie del electrodo se llevó a cabo.

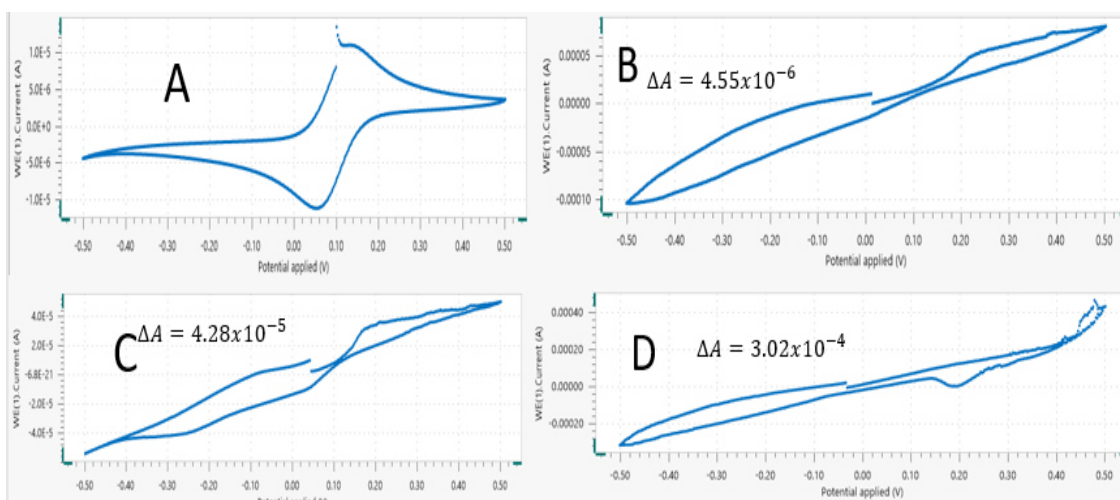


Figura 14. Voltamperogramas (potencial vs corriente) correspondientes a los controles donde A. Es el electrodo solo, B. Es el que solo tiene DSP C: Tiene DSP y el anticuerpo y finalmente D: DSP + Anticuerpo + BSA.

Finalmente, en los ensayos se observa que la reducción en los picos es dependiente a la concentración del antígeno.

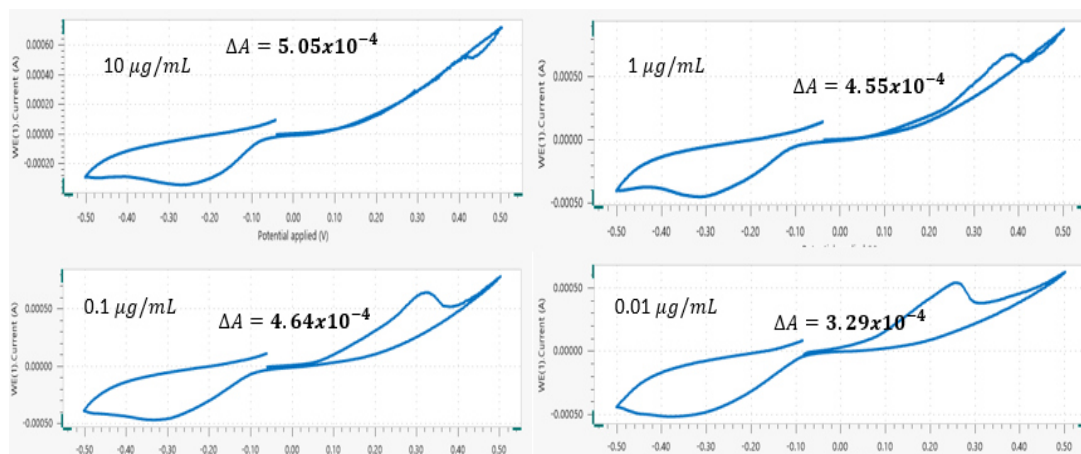


Figura 15. Voltamperogramas (potencial vs corriente) correspondientes a los ensayos a diferentes concentraciones de H1. La corriente fue medida 2 días después de que la reacción antígeno-anticuerpo se llevara a cabo. Se observa que la reducción en los picos que es proporcional a la concentración del antígeno; esto es congruente con el hecho de que la reacción antígeno-anticuerpo bloquea la transferencia de electrones entre el par redox y la superficie del biosensor. (Diouani et al 2015)

En primera instancia estos resultados presentan el comportamiento esperado en la respuesta, para confirmarlo se llevó a cabo otras mediciones tanto de controles; en los cuales los resultados obtenidos confirman los obtenidos previamente, como mediciones de ensayos (figura 16) donde al igual que lo observado previamente, la reducción en los picos es de a la concentración del antígeno, sin embargo, es menester mencionar que la reducción de la corriente con el antígeno de mayor concentración es menos intensa que en las anteriores y que la reacción antígeno anticuerpo en este caso se llevó a cabo el mismo día que la medición, mientras que en el caso anterior hay dos días de diferencia entre estas. Esto podría indicar poca estabilidad en el sistema y que la reacción

antígeno-anticuerpo sigue ocurriendo aún después de dos días de haberse llevado a cabo, lo que se traduce en un corto periodo de vida media del biosensor.

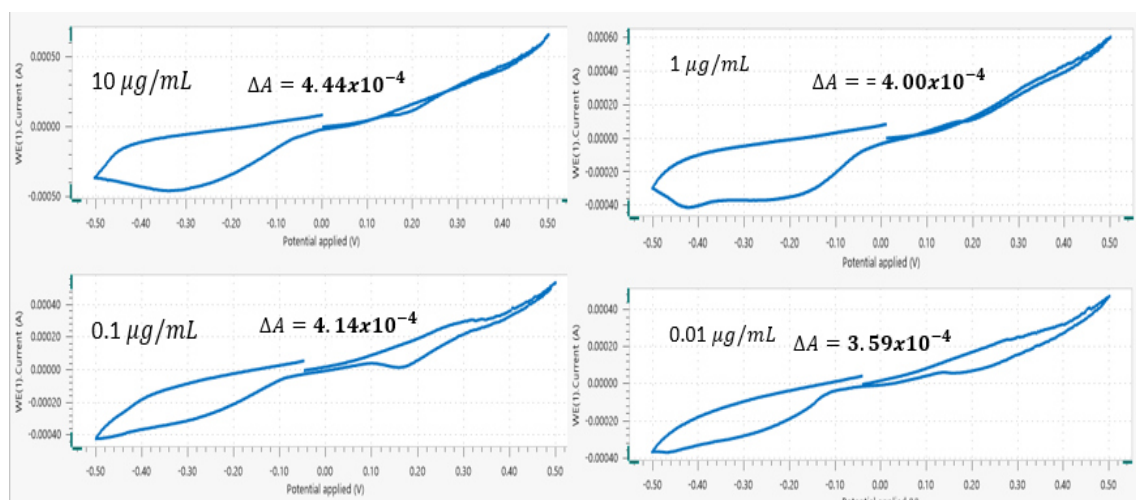


Figura 16. Voltamperogramas (potencial vs corriente) correspondientes a los ensayos a diferentes concentraciones de H1. La corriente fue medida el mismo día que la reacción antígeno-anticuerpo se llevara a cabo. Es menester mencionar que existen diferencias en la conductividad entre estos ensayos y los anteriores

Luego de esto, se quiso probar si el biosensor desarrollado era capaz de detectar a la proteína hemaglutinina 1 en una muestra real; para ello se obtuvo suero sanguíneo de un individuo sano y luego a ese mismo suero se le añadió antígeno; quedando a las mismas concentraciones utilizadas previamente. Se prepararon laminillas nuevas de controles y ensayos de la misma manera que en los procesos anteriores con dos diferencias principales; la primera es la adición de un nuevo control, es decir, una laminilla que en la que se siguió el mismo proceso de inmovilización del anticuerpo para finalmente, en lugar de añadir antígeno se añadió suero sano (figura 17), esto con la finalidad de determinar si el biosensor es capaz de llevar a cabo la reacción antígeno-anticuerpo específica ignorando así la presencia de otras proteínas en la matriz.

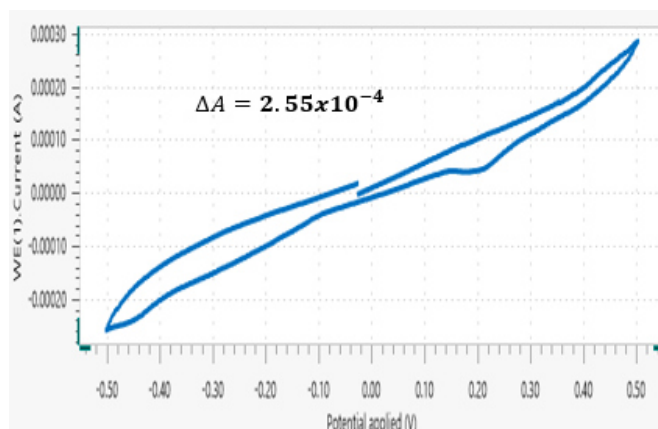


Figura 17. Voltamperograma del control negativo. Laminilla con DSP+ Anticuerpo + BSA + Suero sano. El suero no parece tener influencia significativa en la medición, lo cual indica que el biosensor es capaz de discriminar entre el antígeno específico y otras posibles proteínas presentes en la matriz.

La segunda diferencia es que, en lugar de usar el antígeno puro para los ensayos, se utilizó el suero al que previamente se le añadió la proteína. (figura 18)

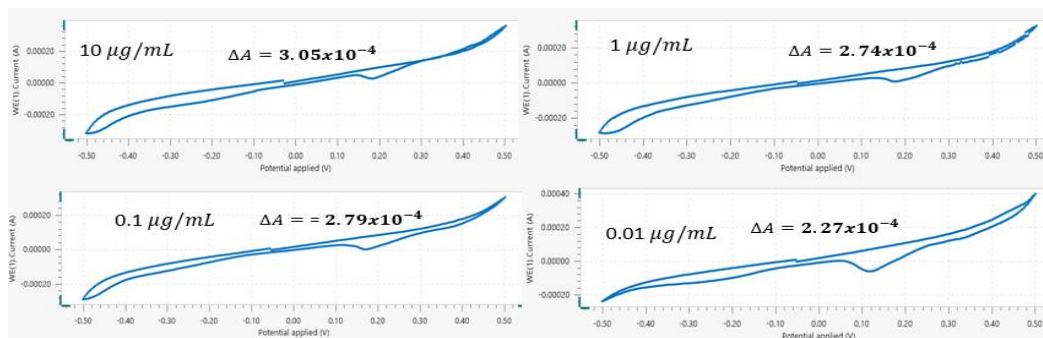


Figura 18: Voltamperogramas de los electrodos con suero al que se le añadió H1, los cuales presentan el patrón ya mencionado anteriormente con las muestras de antígeno puro. Es decir, una reducción en los picos dependiente de la concentración del antígeno

Al añadir el suero, no se observa el aumento en la corriente producido por la reacción antígeno-anticuerpo, lo cual indica que el biosensor es capaz de discriminar entre el antígeno específico y otras posibles proteínas presentes en

la matriz; lo que se confirma con las mediciones de los electrodos con suero al que se le añadió antígeno, los cuales presentan el patrón ya mencionado anteriormente con las muestras de antígeno puro, es decir, la reducción en la corriente es dependiente a la concentración de la proteína.

Tabla 4. Parámetros voltamperométricos

Electrodo	I_{pc}	E_{pc}	I_{pa}	E_{pa}	ΔE	Potencial redox	Relación pico-corriente
Blanco	-1.1×10^{-5}	0.05218	0.1010	0.1010	-0488	0.076	-9056.08
DSP	-1.6×10^{-5}	-0.5014	0.5020	0.5020	-1.003	0.0003	-31954.15
DSP/Anti-H1	-5.4×10^{-5}	-0.5	4.98×10^{-5}	0.5009	-1.0009	0.00045	-0.9189
DSP/Anti-H1/BSA	-3.1×10^{-4}	-0.5008	0.000454	0.4806	-0.98145	-0.01	-1.4469
Dsp/Anti-H1/BSA/Suero	-2.6×10^{-4}	-0.5012	0.00318	0.4997	-1.010	-0.00076	-1.22039
Antígeno 10 $\mu g/mL$ (1)	-5.0×10^{-4}	-0.2722	0.00063	0.5079	-0.8789	0.06134	-1.2118
Antígeno 1 $\mu g/mL$ (1)	-4.66×10^{-4}	-0.3334	0.00078	0.5015	-0.8349	0.08407	-1.67725
Antígeno 0.1 $\mu g/mL$ (1)	-4.63×10^{-4}	-0.3052	0.00079	0.5004	-0.8057	0.09766	-1.656
Antígeno 0.01 $\mu g/mL$ (1)	-3.40×10^{-4}	-0.2722	0.00071	0.4992	-0.7714	0.1135	-2.1028
Antígeno 10 $\mu g/mL$ (2)	-4.60×10^{-4}	-0.3363	0.000656	0.501	-0.00046	0.0823	-1.4374
Antígeno 1 $\mu g/mL$ (2)	-4.1×10^{-4}	-0.422	0.000601	0.5007	-0.92285	0.0396	-1.4951
Antígeno 0.1 $\mu g/mL$ (2)	-4.1×10^{-4}	-0.5002	0.000536	0.5008	-1.00098	0.000305	-1.26049
Antígeno 0.01 $\mu g/mL$ (2)	-3.70×10^{-4}	-0.4661	0.000472	0.5006	-0.9668	0.017242	-1.27343
Antígeno 10 $\mu g/mL$ (3)	-3.2×10^{-4}	-0.4992	0.00036	0.5017	-1.00098	0.001221	-1.13682
Antígeno 1 $\mu g/mL$ (3)	-2.8×10^{-4}	-0.4884	0.000326	0.5003	-0.98876	0.005951	-1.144553
Antígeno 0.1 $\mu g/mL$ (3)	-2.8×10^{-4}	-0.5014	0.000307	0.5020	-1.00341	0.000305	-1.059263

Antígeno 0.01 $\mu\text{g/mL}$ (3)	-2.4×10^{-4}	-0.5008	0.000401	0.5002	-1.00098	-0.00031	-1.68418
--	-----------------------	---------	----------	--------	----------	----------	----------

Finalmente, es importante determinar el límite de detección (LD), es decir la menor cantidad de hemaglutinina 1 en una muestra que podría detectarse en el biosensor desarrollado, el LD se obtiene de la siguiente manera

$$LD = 3 \sigma / m$$

donde: σ = desviación estándar del blanco y m = pendiente de la curva de calibración.

Los datos que se utilizarán para obtener el LD son los correspondientes a los ensayos con suero al acercarse más a las muestras reales, de forma que.

$$\sigma = 1.5 \times 10^{-6}$$

y obteniendo la ecuación de la recta

$$y = -5 \times 10^{-6} x - 0.0003$$

Entonces LDD queda

$$LDD = 8.97 \times 10^{-6} \mu\text{g/mL}$$

Adicionalmente, para observar la estabilidad del biosensor se realizaron mediciones de voltamperometría en laminillas cuatro meses después de su preparación (figuras 19-22) en dichos ensayos se observa que el electrodo sin modificación dio un voltamperograma cíclico con un comportamiento típico del par redox del ferrocianuro/ferricianuro. En todos los controles se vio dicho comportamiento como base, con diferencias en cada uno de ellos: en aquel al

que se le añadió únicamente DSP se vio un desplazamiento y pico nuevo de reducción. El que tenía el anticuerpo presenta varios picos extra de reducción y oxidación pronunciados. El del DSP y BSA no se observó desplazamiento a diferencia del que solo tiene DSP y se observan picos extra en oxidación.

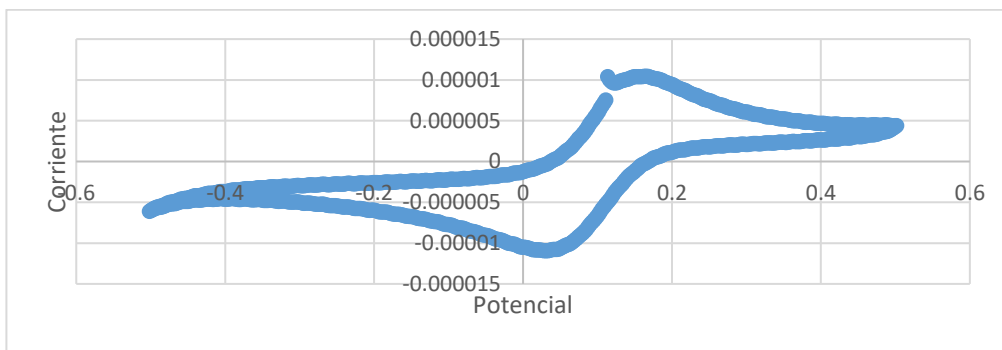


Figura 19. Blanco. Electrodo sin modificar

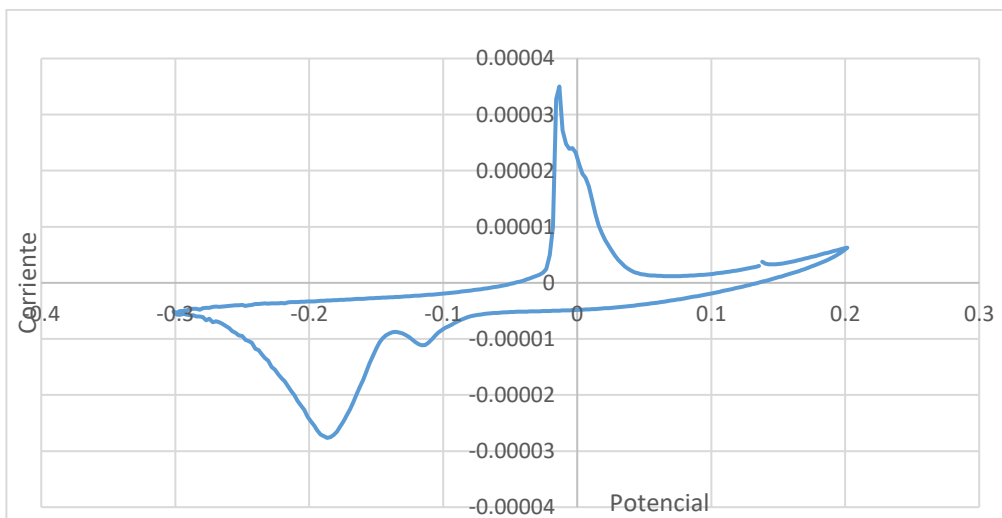


Figura 20. Electrodo al que únicamente se le añadió DSP

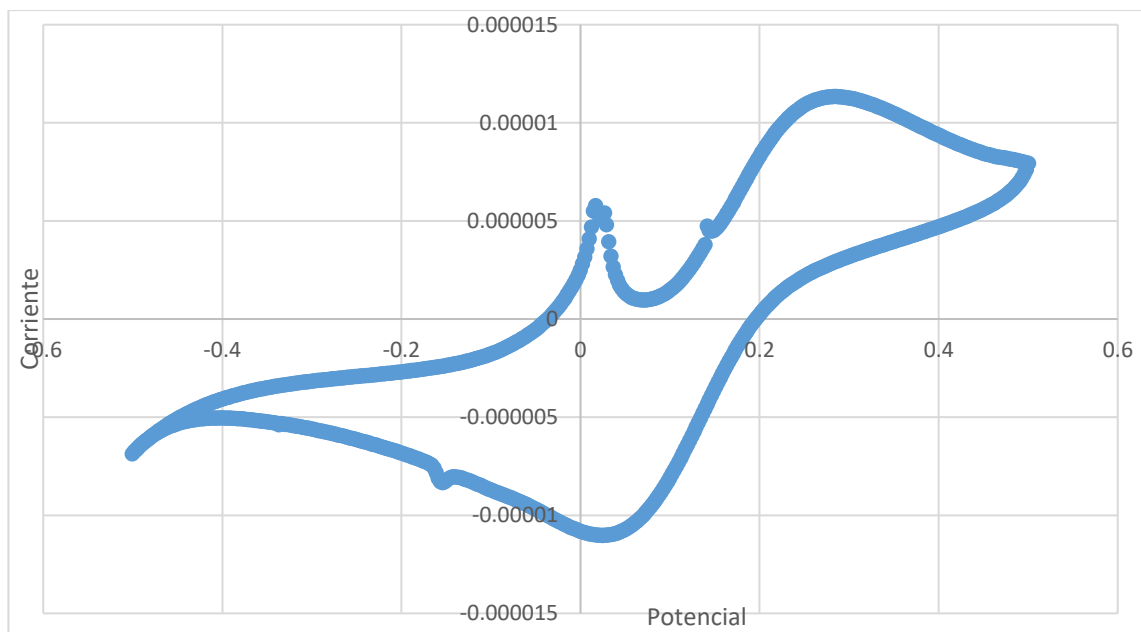


Figura 21. Electrodo al que se adicionó DSP y Anticuerpo

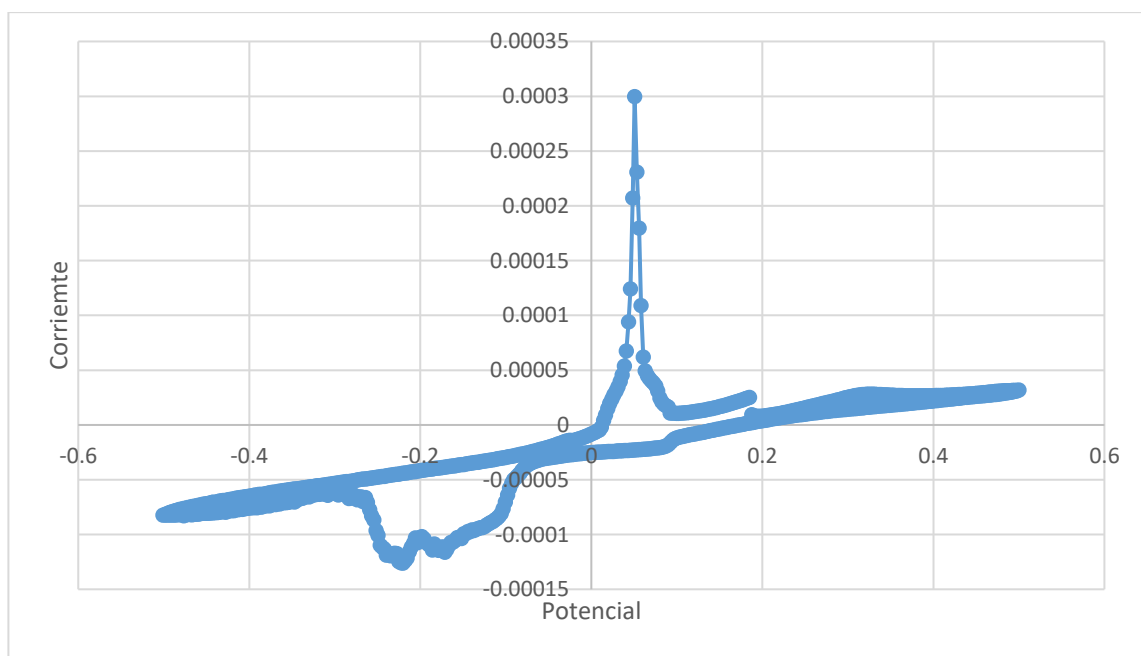


Figura 22. Electrodo al que se adicionó DSP y BSA

En los ensayos con antígeno (figuras 23-25) se observó poca conductividad. Estos ensayos corresponden a las concentraciones de antígeno de: $10 \mu\text{g/mL}$, $1 \mu\text{g/mL}$ y $0.1 \mu\text{g/mL}$ respectivamente.

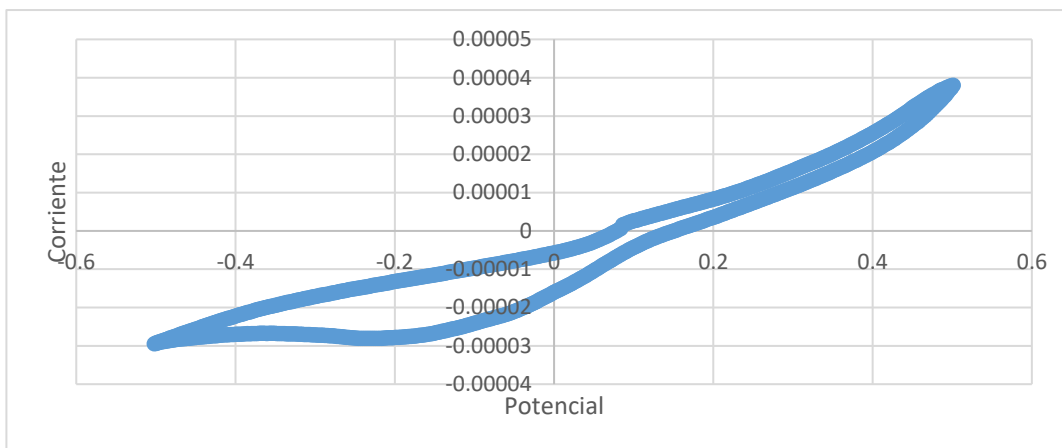


Figura 23 Electrodo con Antígeno a una concentración de $10 \mu\text{g/mL}$

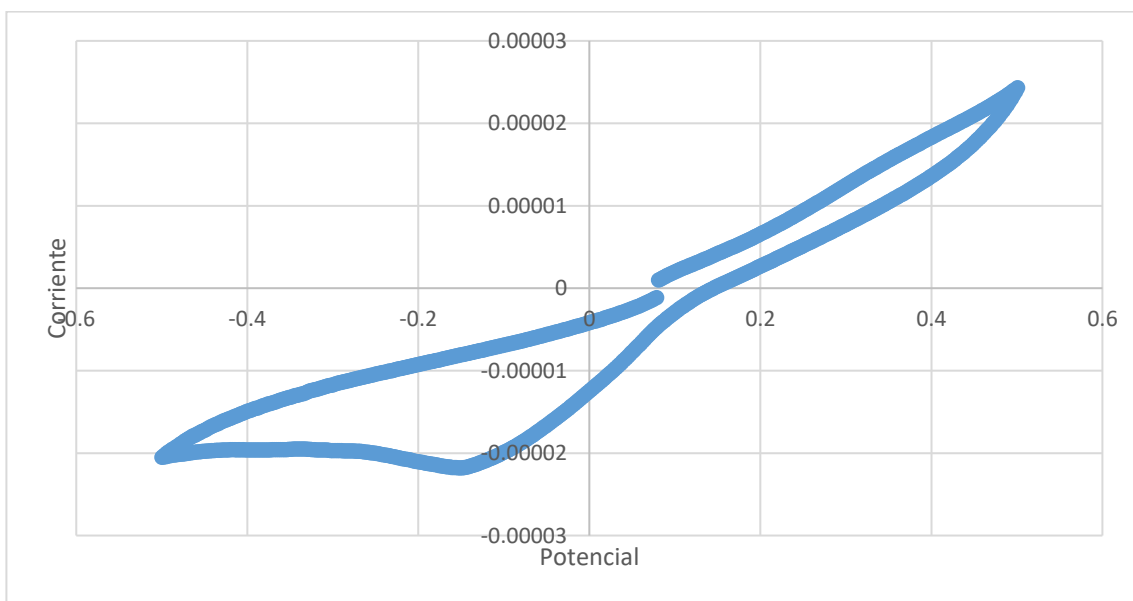


Figura 24 Electrodo con Antígeno a una concentración de $1 \mu\text{g/mL}$

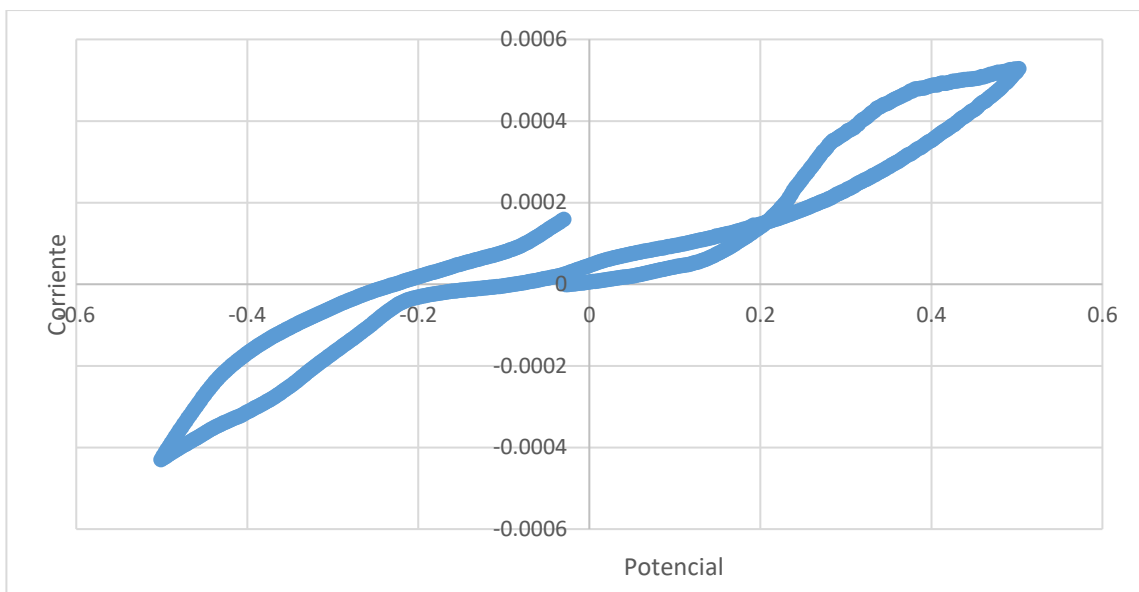


Figura 25 Electrodo con Antígeno a una concentración $0.1 \mu\text{g/mL}$

Los resultados obtenidos en esta parte, podrían indicar que el biosensor ya ha pasado su vida útil ya que, por ejemplo, los controles presentan comportamientos muy distintos a los observados en las mediciones con laminillas medidas el mismo día o pocos después de su preparación.

Capítulo 7. Discusión de resultados

Los resultados de las mediciones indican que el biosensor desarrollado es capaz de detectar a la proteína debido a la reacción antígeno-anticuerpo tanto en estado puro como en una matriz compleja como es el suero humano; esto es congruente con lo que ya han reportado otros investigadores como Tang et al en 2006, Malecka et al en 2011 y Diouani et al en 2015, en sus voltamperogramas se observa que conforme se modifica la superficie, la transferencia de electrones en el par redox de ferrocianuro/ferricianuro se ve perturbada, hecho que se manifiesta en la reducción de los picos de las gráficas, lo que es consistente debido a que estas modificaciones actúan como barreras y se comprueba la inmovilización de dicha sustancia en la superficie del electrodo.

Se pudo observar que las reducciones debidas a la inmovilización DSP y el anticuerpo son leves, sin embargo, esto es distinto para el caso del BSA, con esta sustancia se produjo la mayor disminución de la corriente. Se encuentra que este fenómeno también ha ocurrido en otros trabajos, destacando el de Diouani et al 2015. Luego del bloqueo con BSA y la adición de antígenos se produjo aumento ligero aumento transferencia de electrones, lo que se atribuye al ensamblaje de estas capas, esto aunado a que dicho aumento de la corriente es dependiente de la concentración de antígeno, siendo mayor conforme menor sea la concentración de antígeno, de manera que se obtiene que aquellos electrodos tratados con mayor concentración presentan una menor conductividad con respecto al blanco, es decir, que si bien la reacción antígeno-anticuerpo permite que aumente levemente la transferencia de electrones luego del bloqueo con

BSA, esto ocurre principalmente a concentraciones menores, bloqueándose de nuevo a medida que va aumentando la concentración del antígeno, lo que es un indicativo que la inmovilización se realizó según lo esperado.

También es importante mencionar que los resultados obtenidos también son congruentes con lo reportado por Nidzworski et al en 2017, Talan et al en 2018 y Bhradwaj en 2019; en donde se obtuvo la diferencia existente entre los picos del voltamperograma del electrodo sin modificar con aquellos correspondientes a los distintos ensayos con los respectivos antígenos. Se obtuvo que efectivamente esta diferencia es dependiente de la concentración de los antígenos; atribuyendo esto a lo mencionado anteriormente, la obstrucción de la transferencia de electrones entre la solución redox y el electrodo conforme va aumentando según mayor sea la concentración de la proteína.

Es menester mencionar que se realizó una prueba de detección de antígeno en suero humano y los resultados indican que el biosensor es capaz de discriminar entre las diferentes proteínas presentes en la matriz de una muestra; esto es concordante con Diouani et al 2015 donde, con la finalidad de probar la especificidad de su biosensor realizó el mismo procedimiento de modificación de la superficie solo que en lugar de añadir el antígeno específico utilizó otra proteína que también está presente en la bacteria y sus resultados indicaron que el anticuerpo inmovilizado fue capaz de discriminar entre su antígeno específico y otra proteína similar.

Para tener una idea de la estabilidad del biosensor se aprovecharon laminillas que se prepararon pero no se llevaron a cabo las mediciones electroquímicas

hasta cuatro meses después, Si bien lo observado en dichas mediciones, puede deberse a la reacción antígeno-anticuerpo, [Tang 2006] también pueden deberse a que terminó la vida útil del biosensor [Pingarrón 2008, Thevenot 1999], esto se realizó. Hay poca información acerca de cuánto tiempo de vida útil tiene un inmunobiosensor luego de llevar a cabo la reacción antígeno anticuerpo, algunos estudios indican que esta es variable, algunos de solo 14 días a otros de hasta 4 meses. (ver tabla 5)

Tabla 5 tiempo de vida de algunos biosensores electroquímicos.

Electrodo	Tiempo de vida	Autor
Platino	1 mes	Tang 2004
Platino	1 mes	Tang 2005
Oro	1 mes	Tang 2006
Platino	4 mes	Tang 2004
Oro	3 meses	Zhuo 2005
Oro	90 días	XU 2006

De todos estos destaca, por ser el más parecido al nuestro, el estudio realizado por Tang *et al* en 2006 donde realizaron mediciones del biosensor al momento de que se puso al antígeno en contacto con los antígenos inmovilizados y luego de un mes y se observa una reducción en la respuesta, lo que parece estar relacionado con la inactivación gradual del anticuerpo.

Más recientemente Talan *et al* en 2018 decidió probar la estabilidad de su biosensor, por lo que se almacenó a 4°C durante 21 días luego de los cuales no se encontraron diferencias significativas en las mediciones; no fue hasta otros 20 días después que se empezaron a manifestar dichas diferencias, aunque fuera mínimamente, lo que confirma la estabilidad del biosensor desarrollado.

Si bien como se mencionó los biosensores cuentan con una mayor vida útil mientras no se lleve a cabo aún procesos biológicos, esto depende de muchos factores, como la temperatura, humedad, pH etc. Esto podría explicar como algunos biosensores presentan mayor estabilidad que otros ya que no en todas partes se cuenta con el mismo control de las condiciones mencionadas anteriormente por lo que es posible que durante el tiempo transcurrido entre la preparación de las laminillas de noviembre hasta su medición hayan ocurrido anomalías en el almacenamiento que pudieran haber alterado los resultados obtenidos.

Capítulo 8 Conclusiones

Se logró desarrollar un biosensor electroquímico capaz de detectar la presencia de la proteína hemaglutinina 1 mediante una reacción antígeno-anticuerpo.

Se realizaron los ensayos de detección de antígenos, tanto con la proteína en estado puro, es decir, una muestra con las condiciones controladas, y como estaba esperado, se logró la detección de la proteína y finalmente, se propuso detectar al antígeno en muestras “reales”; se trabajó con suero de un individuo sano al cual se le añadió antígeno. Los resultados obtenidos determinan que efectivamente el biosensor desarrollado es capaz de discriminar entre la hemaglutinina 1 y el resto de proteínas presentes en esta matriz compleja gracias a la reacción específica de antígeno-anticuerpo.

Comparando los resultados de las mediciones de los ensayos preparados y medidos con diferentes tiempos de antigüedad, podría dar una idea de la vida libre del biosensor, la cual se confirma como poco estable luego de cuatro meses de su preparación. Para concluir se utilizaron los resultados de laminillas preparadas y medidas ese mismo día, y donde hubo días de diferencia respectivamente entre la reacción antígeno-anticuerpo y su evaluación. Los resultados indican diferencias en la reducción de la corriente entre las laminillas, lo que se traduce a que, si bien el biosensor es capaz de detectar a la proteína, es importante que las mediciones se lleven a cabo lo más pronto posible luego de llevar a cabo el proceso biológico.

Referencias

- 1) Vargas. "Virología médica" 2da edición. Editorial El Manual Moderno. Colombia 2016 ISBN: 9587758226
- 2) Krejcova *et al.* "Electrochemical Sensors and Biosensors for Influenza Detection". Int. J. Electrochem. Sci. 2012: 1(7)10779 – 10801
- 3) Morcillo *et al.* "Biotecnología y alimentación" Editorial UNED. España 2013. ISBN: 843626665X
- 4) Yao *et al.* "Biosensors for hepatitis B virus detection". World J Gastroenterol 2014: 21; 20(35)12485-12492
- 5) Rai *et al.* "Ultrasensitive c DNA Detection of Dengue Virus RNA Using Electrochemical Nanoporous Membrane-Based Biosensor" PLoS ONE 2012: 7(8)1-7
- 6) Bai *et al.* "A SPR Aptasensor for Detection of Avian Influenza Virus H5N1" Sensors 2012: (12)12506-12518
- 7) Owen T. *et al.* "Microgravimetric immunosensor for direct detection of aerosolized influenza A virus particles". ELSEIVER 2007: (126) 691–699
- 8) Chang Y *et al.* "Detection of swine-origin influenza A (H1N1) viruses using a localized surface plasmon coupled fluorescence fiber-optic biosensor" ELSEIVER 2010: (26) 1068–1073
- 9) Endo T *et al.* "Reflectometric detection of influenza virus in human saliva using nanoimprint lithography-based flexible two-dimensional photonic crystal biosensor" ELSEIVER 2010: (148)269-276

- 10) Diouani M *et al.* "Detection of ESAT-6 by label free miniature immune-electrochemical biosensor as a diagnostic tool for tuberculosis" ELSEIVER 2016: (74)465-470
- 11) Wang J *et al.* "DNA Electrochemical Biosensor for the Detection of Short DNA Sequences Related to the Human Immunodeficiency Virus" Anal. Chem., 1996, 68 (15), pp 2629–2634
- 12) Zhang *et al.* "Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction" ELSEIVER 2000: (15)273–28
- 13) CONAVE. Actualización de la situación de influenza durante la Temporada 2015-2016. Disponible en línea en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/225122/AE_influenza_100216.pdf consultado el 1-nov-2017 a la 1:30 pm.
- 14) Gopinath *et al.* "Correction: Observations of Immuno-Gold Conjugates on Influenza Viruses Using Waveguide-Mode Sensors". PLOS ONE 2013 8(12)
- 15) Shors "Virus: Estudio molecular con orientación clínica" Ed. Médica Panamericana. 2009 ISBN: 978-950-06-1879-3
- 16) Vincent *et al.* Development of a Dot-Blot Assay for the Detection of Mould-Specific IgE in the Belgian Population. 2016: 182(3–4): 319–329
- 17) Daniels JS "Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges" Electroanalysis. 2007 May 16; 19(12): 1239–1257.
- 18) Lum *et al.* "Rapid detection of avian influenza H5N1 virus using impedance measurement of immuno-reaction coupled with RB Amplification" Biosensors and Bioelectronics 38 (2012) 67–73

- 19) Lin *et al* "An impedance immunosensor based on low-cost microelectrodes and specific monoclonal antibodies for rapid detection of avian influenza virus H5N1 in chickens wabs" *Biosensors and Bioelectronics* 67(2015)546–552
- 20) Zhang *et al* "A Portable Impedance Biosensor for Detection of Multiple Avian Influenza Viruses" 978-1-4673-4642-9/13/ ©2013 IEEE
- 21) Hassen *et al* "Quantitation of influenza A virus in the presence of extraneous protein using electrochemical impedance spectroscopy" *Electrochimica Acta* 56 (2011) 8325– 8328
- 22) Mokhtarzadeh *et al* "Nanomaterial-based biosensors for detection of pathogenic virus" *Trends in Analytical Chemistry* 97 (2017) 445e457
- 23) Hassanpour *et al* "Recent trends in rapid detection of influenza infections by bio and nanobiosensor" *Trends in Analytical Chemistry* 98 (2018) 201-215
- 24) Sayhi *et al* 2018 "Electrochemical detection of influenza virus H9N2 based on both immunomagnetic extraction and gold catalysis using an immobilization-free screen-printed carbon microelectrode" *Biosensors and Bioelectronics*, 2018.02.018
- 25) Tepeli *et al* 2018 "Electrochemical biosensors for influenza virus a detection: The potential of adaptation of these devices to POC systems "Sensors and Actuators B 254 (2018) 377–384
- 26) Caygill *et al* 2010 "A review on viral biosensors to detect human pathogens" *Analytica Chimica Acta* 681 (2010) 8–15
- 27) Diouani *et al* 2008 "Miniaturized biosensor for avian influenza virus detection" *Materials Science and Engineering C* 28 (2008) 580–583

- 28) Frasconi et al 2010 "Protein immobilization at gold–thiol surfaces and potential for biosensing" *Anal Bioanal Chem* (2010) 398:1545–1564
- 29) Frederix et al 2003 "Enhanced Performance of an Affinity Biosensor Interface Based on Mixed Self-Assembled Monolayers of Thiols on Gold" *Langmuir* 2003, 19, 4351-4357
- 30) Barreiros dos Santos et al. Highly sensitive detection of pathogen *Escherichia coli* O157:H7 by electrochemical impedance spectroscopy. *Biosensors and Bioelectronics*. 2013, 45:174–180.
- 31) Nandakumar et al. A methodology for rapid detection of *Salmonella typhimurium* using label-free electrochemical impedance spectroscopy *Biosensors and Bioelectronics*. 2008 24:1039–1042
- 32) Tolba et al. A bacteriophage endolysin-based electrochemical impedance biosensor for the rapid detection of *Listeria* cells *Analyst*. 2012
- 33) Braiek et al An Electrochemical Immunosensor for Detection of *Staphylococcus aureus* Bacteria Based on Immobilization of Antibodies on Self-Assembled Monolayers-Functionalized Gold Electrode *Biosensors* 2:417-426.
- 34) Wang et al Interdigitated array microelectrode-based impedance immunosensor for detection of avian influenza virus H5N1 *Talanta*. 2009, 79 159–164.
- 35) Lee et al 2014 "Electrochemical-DNA Biosensor Development Based on a Modified Carbon Electrode with Gold Nanoparticles for Influenza A (H1N1) Detection: Effect of Spacer" *Int. J. Electrochem. Sci.*, 9 (2014) 6793 - 6808
- 36) Pensa et al 2011 "The Chemistry of the SulfurGold Interface: In Search of a Unified Model" *ACCOUNTS OF CHEMICAL RESEARCH* 1183–1192' 2012' Vol. 45, No. 8

- 37) Yoon et al 2011 “Immobilization of antibodies on the self-assembled monolayer by antigen-binding site protection and immobilization kinetic control J. Biomedical Science and Engineering, 2011, 4, 242-247
- 38) OMS Reporte de Influenza SE 52 2017
- 39) Jazayeri *et al* 2016 Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies Sensing and Bio-Sensing Research Volume 9, Pages 17-22
- 40) Mehrotra P. “*Biosensors and their applications – A review*”, J Oral Biol Craniofac Res. 2015, 2212-4268
- 41) Ronkainen et al “Electrochemical biosensors” Chem. Soc. Rev. 2010, 39, 1747–1763
- 42) Gopinath et al. “Correction: Observations of Immuno-Gold Conjugates on Influenza Viruses Using Waveguide-Mode Sensors”. PLOS ONE 2013, 8(12)
- 43) Malecka et al. “Voltammetric Detection of a Specific DNA Sequence of Avian Influenza Virus H5N1 Using HS-ssDNA Probe Deposited onto Gold Electrode” Electroanalysis 2012, 24, No. 2, 439–446
- 44) Gómez-Biedma et al. “Análisis electroquímico” Rev Diagn Biol vol.51 no.1 ene./mar. 2002
- 45) Chen *et al* “Electrochemical sensing and biosensing based on square wave voltammetry: Anal.Methods,2013,5,2158
- 46) Siuzdaka et al “Biomolecular influenza virus detection based on the electrochemical impedance spectroscopy using the nanocrystalline boron-doped diamond electrodes with covalently bound antibodies” Sensors & Actuators: B. Chemical 280 (2019) 263–271
- 47) Tang *et al* “Electrochemical detection of hepatitis B surface antigen using colloidal gold nanoparticles modified by sol-gel network interface” Clinical Biochemistry 39 (2006) 309–314

- 48) Pingarrón *et al* “Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors”
Electrochimica acta 53 (2008) 5848-5866
- 49) Thevenot *et al* “Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. Pure and Applied Chemistry, De Gruyter, 1999, 71(12), pp.2333 – 2348
- 50) Bhradwaj *et al* 2019. “Subtyping of Influenza A H1N1 virus using a label-free electrochemical biosensor based on the DNA aptamer targeting the stem region of HA protein
- 51) Talan *et al* 2018 “Ultrasensitive electrochemical immuno-sensing platform based on gold nanoparticles triggering chlorpyrifos detection in fruits and vegetable”
- 52) Elgrishi *et al* 2018 “A Practical Beginner’s Guide to Cyclic Voltammetry”
- 53) Nidzworski *et al* 2017 “A rapid-response ultrasensitive biosensor for influenza virus detection using antibody modified boron-doped diamond”